

報

告

PCR-RFLP法の麻疹ウイルス検査への応用

斎藤 博之 原田誠三郎 田中 恵子 佐野 健
須藤 恒久 森田 盛大

我々は1994年、麻疹ウイルスの存在を患者検体からPCRを用いて直接検査できる方法を開発、報告した。この方法は迅速同定のみならず、近年問題になっている麻疹ウイルスの変異も同時に検出できるのが特長で、年代別・地域別の疫学調査等でも効果を上げてきた。本報では実際の活用事例を通して今後の問題点を考察した。

キーワード：麻疹ウイルス，PCR，RFLP

I はじめに

平成元年より始まった麻疹ウイルスに関する研究も今年度で一つの区切りを迎えることになった。6年間の研究により最近分離された麻疹ウイルスは、HA蛋白の性状がこれまで知られていたものとは異なっていることが明らかとなった¹⁻⁴⁾。すなわち、①赤血球凝集能の欠落、②分子量の増大、③6本目の糖鎖付加部位の新生である。

我々は、最近分離された麻疹ウイルスのHA遺伝子の配列をもとにしてPCR法による迅速検査法と変異ウイルスの迅速鑑別法を開発した⁵⁻⁶⁾。本法を用いれば、迅速に麻疹ウイルスの存在を検出することにとどまることなく、そのウイルスが従来型(classical type)か最近分離されるような変異型(contemporary type)かを知ることができるため応用範囲は広いと考えられる。本報ではその活用事例として2例(年代別・地域別の疫学調査成績、ワクチン接種後の副反応鑑別事例)を報告する。

II 方法

検体処理法とPCRによる増幅、およびRFLPによる型鑑別の方法は前年度の本誌⁵⁾を参照されたい。補足として、血清をグアニジンチオシアネート法で処理したときに検体によってはフェノール抽出の際の中間層が大量に生じてうまくいかない場合があるため、その解決法について述べる。同じ血清であるにもかかわらず、患者によってRNA抽出の成否に差が出る原因はよくわかっていない。このような場合、患者血清50 μ lをSTE(0.1M NaCl-10mM Tris/HCl-1 mM EDTA, pH8.0)440 μ lに混合し、10% SDS 5 μ lと10mg/ml Proteinase K 5 μ lを加えて56℃で30~60分反応させた後にフェノール抽出を行えば解決する。しかし、Proteinase Kは比較的高価なため、グアニジンチオシアネート法でうまくゆかない場合に限って用いたほうがよい。

III 結果

1) 疫学への応用事例

最近問題となっている麻疹ウイルスの変異がいつ頃からどのようにして発生・進行してきたのかは研究者ならずとも興味を抱くところである。しかるに、年代ごとにまとまった数の麻疹分離株を収集するのは困難である。従来は麻疹ウイルスは変異しないものと考えられてきたため、インフルエンザのように毎年の分離株を保存しておく意義があまり認められていなかったことも背景にある。当所では患者血清を長期にわたって保存しておくことの重要性を考え、約30年前から1万検体以上を冷凍保存している。ウイルス血症を起こす麻疹の場合には急性期血清に麻疹ウイルス粒子が存在する可能性が想定される。従って、PCR法による麻疹ウイルスの検出と型鑑別には急性期血清も有効材料ではないかと考え、この保存血清を利用して年代別調査を試みたのが図1の成績である。

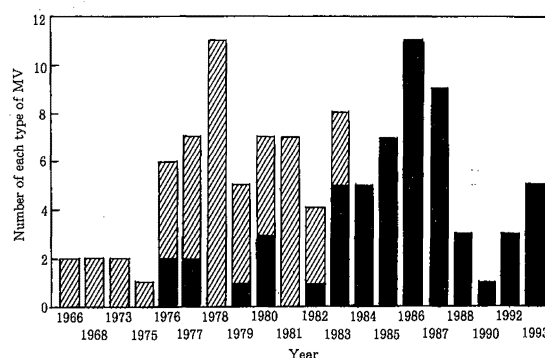


図1 保存血清による28年間の麻疹ウイルスの分子疫学

1966年から1993年までの28年間に収集した麻疹患者の急性期血清106検体から増幅した遺伝子に対して型鑑別を行ったところ、1976年に最初の変異型が見つかり、1980年代中頃には完全に従来型と置き換わっていることが読みとれる。ここで増幅した遺伝子の配列を図2に示すが、変異型ではSau 3 AI 切断部位(箱線で囲った部分)が

	1100					1150				1190
EDMONSTON	TATCGCTGAT	AATCAAGCAA	AATGGGCTGT	CCCGACAACA	CGAACAGATG	ACAAGTTGCG	AATGGAGACA	TGCTTCCAAC	AGGCGTGTA	GGGTAAAAATC
735 (1966)	GC							G.		
40288 (1976)	C	C.			A.....			G.		
41385 (1980)	C				A.....	A.		G.		
41386 (1980)	C				A.....	A.		G.		
41465 (1980)	C				.G.....			G.		A.
42649 (1983)	C				.G.....			G.		A.
42895 (1983)	C				A.....			G.		
44269 (1985)	A....C				.G.....			G.		A.
AK-1 (1988)	C				.G.....			G.		A.
67863 (1993)	C				.G.....			G.		
	1200					1250				1290
EDMONSTON	CAAGCACTCT	GCGAGAATCC	CGAGTGGGCA	CCATTGAAGG	ATAACAGGAT	TCCTTCATAC	GGGGTCTTGT	CTGTTGATCT	GAGTCTGACA	GTTGAGCTTA
735 (1966)										
40288 (1976)						.G..				
41385 (1980)						.G..				
41386 (1980)						.G..				
41465 (1980)								A..		
42649 (1983)								A..		
42895 (1983)						.G..				
44269 (1985)								A..		
AK-1 (1988)								A..		
67863 (1993)			...C..	.C.....				A..		C.
	1300					1350				1390
EDMONSTON	AAATCAAAAT	TGCTTCGGGA	TTCGGGCCAT	TGATCACACA	CGGTTTCAGGG	ATGGACCTAT	ACAAATCCAA	CCACAACAAT	GTGTATTGGC	TGACTATCCC
735 (1966)								.T.....		
40288 (1976)	G..									
41385 (1980)	G..								.C.....	
41386 (1980)	G..								.C.....	
41465 (1980)	C....A..						A.....			
42649 (1983)	A..						A.....		G	
42895 (1983)	G..				T.....			A.....	G	
44269 (1985)	A..						A.....			
AK-1 (1988)	A..						A.....			
67863 (1993)	A..									C.....

図2 保存血清から増幅した麻疹ウイルス遺伝子の配列比較

GATCからAATCに置換していることがわかる。これは変異型の特徴の一つである糖鎖付加部位の新生を意味している。

表1には分離株として保存されていた52株について同様に型鑑別したものである。この中には国立予防衛生研究所の小船富美夫博士から分与していただいた6株が含まれている。また、1992年にザンビアで分離された4株を国立仙台病院の沼崎義夫博士と鈴木博士から分与していただいたので、これもデータとして加えた。前述のとおり、分離株はまとまった数を確保するのが難しく、特に過去の分離株に関するデータが少ないのはいたしかたないが、1980年代中頃からは完全に型が入れ替わっているという傾向は血清で得たデータと一致した。しかし、ザンビアの株では、1992年の株であるにも拘わらず従来型のRFLPを示し、我が国とは違った傾向が認められた。

Japan		
Year	RFLP type	
	Classical	Contemporary
1984	2	1
1985	1	0
1988	0	6
1990	0	3
1991	0	16
1992	0	18
1993	0	1
Zambia		
1992	4	0

表1 分離株による麻疹ウイルスの分子疫学

2) ワクチン接種後の副反応鑑別事例

1994年、患者は1歳の男子でワクチン接種後11日目て発熱とけいれんを起こして受診した。患者の咽頭拭い液に対して本法を行ったところ、図3に示すように従来型のRFLPを示した。我が国では1980年代中頃にはすでに従来型は姿を消しているとの調査結果（上記）から、検出されたウイルスはワクチン株由来である可能性が高いと考えられた。ちなみに我が国で使用されている麻疹ワクチン株は全て従来型RFLPを示すことがわかっている。

IV 考察

麻疹ウイルス検査へのPCR-RFLP法の適用事例を2例報告したが、どちらも本法以外の手段では困難なものばかりである。保存血清中に痕跡程度に存在するウイルス（不活性化したウイルスであってもかまわない）を検出する方法は麻疹以外の年代別疫学調査にも有効で

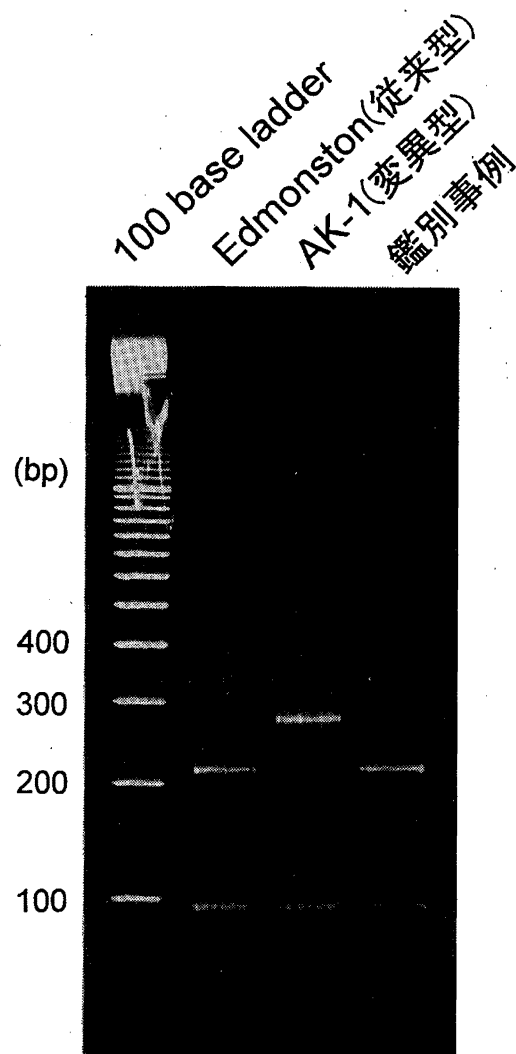


図3 麻疹ワクチン株の鑑別事例

あろう。

図1及び表1で示した麻疹流行株の入れ替わりは我が国の他に米国と中国でも確認されている。原因としてはワクチンによる immuno selective pressure 等様々な説が出されているが、確実な証拠は未だ得られていない。その中で、ザンビアで従来型と思われるウイルスが残存しているというデータは貴重である。麻疹はWHOの3番目の撲滅目標（天然痘、ポリオに次ぐ）として指定される予定であるため、いずれこうした問題も解明されることが期待される。

図3で示したワクチン副反応鑑別事例は、検体に対して本法を適用したこともさることながら、事前に周到な年代別調査を行っていたため可能となった。しかし、ザンビアの例でもわかるように従来型が輸入感染症として持ち込まれる可能性も否定できないので、本人や隣人の海外渡航歴も併せて調査することが望ましい。

麻疹ウイルスの疫学的研究は厚生省予防接種研究班の事業として進められることとなったため、本県単独研究事業としては本年度で役割を終えたが、医療現場からの

依頼に対しては、これまでの知見をもとに積極的に対応していく予定である。

V 文 献

1. Saito, H. et al Isolation and characterization of the measles virus strains with low hemagglutination activity. Intervirology 1992 ; 33 : 57-60.
2. Rota, J.S. et al. Genetic variability of the measles virus hemagglutinin. Virology 1992 ; 188 : 135-142.
3. Sakata, H. et al. Variation in field isolate of measles virus during an 8-year period in Japan. Microbiol Immunol 1993 ; 37 : 233-237.
4. Saito, H. et al. Cloning and characterization of the cDNA encoding the HA protein of a hemagglutination-defective measles virus strain. Virus Genes 1994 ; 8 : 107-113.
5. 斎藤博之, 他. RT-PCR法による麻疹ウイルスの迅速同定・型別法, 秋田県衛生科学研究所報, 1994 ; 38 : 33-35.
6. Saito, H. et al. Molecular identification of two distinct hemagglutinin types of measles virus by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Molecular and Cellular Probes, 1995 ; 9 : 1-8.